第 41 卷 第 3 期　　昆　虫　学　报　　Vol. 41, No. 3
1998 年 8 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1998

苏云金芽孢杆菌 δ-内毒素的杀虫机理及其增效途径*

张继红　王琛柱　钦俊德
（中国科学院动物研究所，北京　100080）

苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*，Bt）制剂是当前应用最广、最有效的微生物杀虫剂。Bt 属于革兰氏阳性细菌，在形成芽孢的同时，产生伴孢晶体。伴孢晶体是 Bt 杀虫活性的主要来源，它可能由几种晶体蛋白即 δ-内毒素组成。δ-内毒素的专一性很强，根据杀虫范围及基因序列的同源性可分为两类：一类是 Cry，在活体和离体条件下只对鳞翅目、双翅目或鞘翅目幼虫有毒，这是主要的一类；另一类是 Cyt，活体条件下只对双翅目幼虫有毒，离体条件下具广谱性。Cry 毒素又可分为四种类型，Cry Ⅰ 对鳞翅目幼虫有毒，Cry Ⅱ 对鳞翅目和双翅目均有毒，Cry Ⅲ 对鞘翅目有毒，Cry Ⅳ 对双翅目有毒[1]。通常一种毒素只能杀死某一目的部分易感昆虫，对益虫及脊椎动物无毒，是一种安全有效的杀虫蛋白[2]。因此，三十年来，Bt 一直被用于农林业害虫和卫生害虫的防治。但是，作为一种商用杀虫剂，Bt 存在着环境耐受性低、杀虫效力不高、杀虫谱窄的缺点[3]。尤其杀虫效力不高的问题，使其防治害虫的效果受到了制约。如何提高毒效成为今后 Bt 生防工作的重点。而了解和掌握 δ-内毒素的杀虫机理将为解决这些问题提供理论上的指导。有关 δ-内毒素的作用机制已有综述[1~3]，但从 δ-内毒素的作用方式探讨其增效途径的文章尚不多见。鉴于鳞翅目幼虫种类繁多，为害严重，这方面的工作做得也比较多。本文将主要综述 Cry Ⅰ 毒素被昆虫取食后，在昆虫中肠的致毒过程，并探讨提高 Bt 毒效的可能途径。

1　δ-内毒素的杀虫机理

一般认为 δ-内毒素的作用过程要经溶解、酶解活化、与受体结合、插入和孔洞或离子通道形成等五个环节。δ-内毒素被昆虫取食后，在昆虫中肠内溶解为前毒素，经中肠蛋白酶水解，释放出活力片段。活力片段穿过围食膜，与中肠上皮细胞刷状缘膜的受体结合，进一步插入膜内，形成孔洞或离子通道，引起离子渗漏，水随之进入中肠细胞，导致细胞膨胀解体。另外，离子梯度的破坏，也扰乱了中肠内正常的跨膜电势及酸碱平衡，影响了养分的吸收。

1.1　溶解

晶体蛋白可以溶解于 pH＞12或 pH＞9.5并加有巯基试剂的碱性溶液中[4]。中肠内环

* 国家自然科学基金和中国科学院动物研究所所长择优基金资助项目
1996-08-16收稿

境诸如pH值、还原电势、去垢性、体积等都可能影响δ-内毒素在昆虫体内的溶解性[2]。鳞翅目幼虫的中肠pH值一般都较高，呈碱性，对δ-内毒素的溶解很有利。溶解性可影响晶体作用的专一性，是决定晶体毒力的因素之一，它取决于晶体蛋白组成及其与昆虫中肠内环境的相互作用。据报道，一种无杀虫活性的土壤分离株经溶解后对烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫有显著毒力[5]。由Bt鲇泽（*aizawai*）亚种HD133品系经质粒处理而成的品系所产生的伴孢晶体对抗性印度谷螟 *Plodia interpunctella* 和另两种鳞翅目幼虫的毒力大大低于原品系，但二者溶解后的前毒素毒力相同。另外，质粒处理品系的伴孢晶体没有CryIA（b）毒素，溶解为前毒素需要更高的pH值。对于草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 幼虫，这两者的伴孢晶体具有与前毒素同等的毒力[6]。因此，伴孢晶体毒力的差异可能因晶体蛋白的组成和昆虫中肠的溶解条件不同所致。

1.2 酶解活化

昆虫中肠内含有多种蛋白酶，溶解的晶体蛋白被中肠蛋白酶水解，由130 kD左右的前毒素，释放出N端的70 kD左右的抗酶多肽活力片段。这些活力片段均没有前毒素稳定，可能是由于失去了C端的结构片段所致。一般认为活力片段至少由两部分组成，即毒力片段和细胞结合片段。毒力片段位于N端，由几个保守的亲水区组成，主要结构是α-螺旋，对于跨膜通道的形成及毒效可能起着重要作用。细胞结合片段由C端的保守区和中间的可变区组成，主要结构是β-片层，负责毒素与靶标昆虫受体的结合，从而决定了毒素的选择性[3]。鲇泽亚种IC1品系的CryIA（b）毒素的专一性就取决于这个可变区。改变这一区域Arg544和Arg567附近的残基后，专一性随之改变，由只对鳞翅目幼虫有毒，变为对鳞翅目、双翅目幼虫都有毒[7]。

中肠酶液的组成直接影响到δ-内毒素的降解活化，对δ-内毒素作用的专一性起着重要作用。在对鲇泽亚种IC1品系的δ-内毒素进行活化时发现，以大菜粉蝶 *Pieris brassicae* 幼虫的中肠提取液活化，毒素既能杀死大菜粉蝶幼虫，也能杀死埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 幼虫；以埃及伊蚊幼虫的中肠提取液活化，则只对埃及伊蚊有毒[7]。

1.3 与受体的结合

δ-内毒素的作用靶位是易感昆虫的中肠上皮，活力片段与柱状细胞刷状缘膜上的受体专一性的结合，这一步是决定δ-内毒素选择性的关键因素。细胞结合片段的可变区趋于极性或带电，有可能暴露出一些亲水性的特殊位点。δ-内毒素以此与中肠上皮刷状缘膜受体的亲水残基相互作用，而形成复合物[2]。

对刷状缘膜囊的不少离体研究都显示，δ-内毒素的毒力正比于它与刷状缘膜囊的结合能力。结合能力的大小表现在两个方面：亲和力与受体量[3]。据报道，印度谷螟的抗性品系和敏感品系相比，CryIA（b）与受体的亲和力下降了50倍[8]。然而，也有一些研究结果与此相左。对于舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫，δ-内毒素的毒力与结合力之间是一种负相关的关系[9]。对马铃薯蛾 *Phthorimaea operculella* 幼虫，CryIA（b）与刷状缘膜囊的亲和力同CryIC相近，毒力却是CryIC的5倍[10]。CryIA对海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的毒力不高，但可与二者的刷状缘膜相结合[11]。因此，δ-内毒素的毒力与其和受体的结合力间不存在一种简单的相关关系。虽然δ-内毒素与受体结合

是其作用机制的重要一步，但这种结合本身还不足以完全决定毒力的大小。

δ-内毒素在昆虫中肠的刷状缘膜上可以有多种受体，毒力的大小与δ-内毒素有几种受体无直接相关性[11]。不同的δ-内毒素在同一种昆虫中可以拥有同一种受体蛋白[12]。受体蛋白的性质尚不完全清楚。English 和 Readdy（1989）提出中肠的碱性磷酸酶可能是CryIA(c)的受体，但纯化的碱性磷酸酶经重组进入缩醛磷脂酰胆碱囊后，虽能增强CryIA(c)与囊的结合，却不能催化δ-内毒素引发的Rb^+的渗漏[13]。结合本身并不足以说明即是受体，作为受体应该也能催化离子通道的形成。之后，他们从烟草夜蛾 *Heliothis virescens* 中肠上皮与CryIA（c）结合的复合物上分离到一种膜组分，将其重组入缩醛磷脂酰胆碱囊后，在CryIA（c）存在时，可催化Rb^+的渗漏[14]。由此看来，碱性磷酸酶可能有助于将CryIA（c）集中到膜上，但不能提供合适的环境以利于δ-内毒素的插入或引发离子的渗漏，因而不能完全表明它即是CryIA（c）的受体。不少研究者认为受体可能是一种糖蛋白，并且从不同的细胞系中找到了与δ-内毒素相结合的受体[3]。但这些细胞系不是取自昆虫中肠上皮细胞，能否反映昆虫中肠的真实情况还有很大疑问，所用δ-内毒素的浓度也远远大于活体所需浓度。Sangala 等首先报道，CryIA（c）在烟草天蛾刷状缘膜囊的结合蛋白由120 kD的氨基肽酶-N和65 kD的磷酸酶组成，其中氨基肽酶-N是主要组分。将二者重组入磷脂囊中，δ-内毒素诱导的Rb^+的释放增大到1 000倍，毒力也提高了35%[15]。另据报道，氨基肽酶-N也是CryIA（c）在舞毒蛾刷状缘膜上的受体[16]。

1.4　插入及孔洞或离子通道的形成

δ-内毒素与刷状缘膜上的受体结合后，插入膜内，形成孔洞或离子通道，导致膜完整性的破坏，引起离子渗漏，水随之进入细胞，细胞因膨胀而解体、死亡。据报道，两种CryIA毒素对舞毒蛾幼虫的毒力与他们和刷状缘膜受体的亲和力成反比，却与形成孔洞的能力相关[17]。

毒素与膜的结合分为可逆和不可逆两种，其中不可逆结合意味着毒素插入了膜内，这一部分所占的比例不同，反映了插入程度的不同，决定了毒力大小的不同[18]。最能说明毒素插入膜内的是离子通道的形成及离子的渗漏。尽管插入的机制还不清楚，但可以设想，毒素的亲水部位与原生质膜受体接触，至少诱导一部分毒素发生构型的改变，暴露出疏水残基而插入膜内[2]。

插入之后，对δ-内毒素的作用方式报道不一。有的研究结果显示δ-内毒素增加了K^+的渗透性[19]，依赖于K^+梯度的氨基酸的吸收也受到抑制[20]。也有些研究结果表明δ-内毒素诱导产生了阳离子选择性通道，依赖于Na^+和K^+梯度的氨基酸的吸收都受到δ-内毒素的抑制，对Cl^-的渗透性未见增长[21,22]。还有些研究结果说明δ-内毒素引发形成了非选择性孔洞[23,24]。后来的研究发现，孔洞的离子传导及选择性是变化的：pH值高时，阳离子渗透性增加；pH值低时阴离子渗透性增加[25,26]。但是，也有证据显示δ-内毒素很可能并未在刷状缘膜上形成孔洞，而是通过直接或间接地与K^+/氨基酸协同运输物质相作用而破坏K^+/氨基酸的协同运输[27]。Reuveni 等（1991）根据鲇泽亚种对氨基酸的吸收的抑制作用提出一种假设：δ-内毒素可能专一性地与一种氨基酸运输物质相结合，引起K^+渗透性增加，进而抑制了依赖于K^+梯度的其他氨基酸的吸收，并指出亮氨酸协同运输物质

可能即是鲇泽亚种在烟草天蛾中肠刷状缘囊的受体[28]。不同品系的 Bt 由于产生的 Cry 蛋白类型不同，不仅杀虫谱不同，而且很可能拥有不同的作用方式。总之，由于 δ-内毒素的作用，可能扰乱了昆虫正常的渗透平衡、离子梯度、pH 的调节及养分的吸收，最终引起中肠上皮细胞的破坏、死亡。

2 δ-内毒素的增效途径

δ-内毒素发挥杀虫效力需要经过多个步骤，修饰或改变其中的每一步都会对毒力产生影响，这就为 δ-内毒素的增效研究提供了多种途径。

2.1 筛选、培育高效菌株

多年来人们一直致力于高效菌株的筛选工作，这是提高毒效、避免抗性产生最直接的途径。Bt 是一种广泛存在的土壤细菌，可以从土壤中得到分离株。另外，从昆虫、植物，以至储物、养蚕的环境中都可以分离到 Bt 菌株。新品系可利用 DNA 探针或根据晶体的形态、与抗血清的反应以及杀虫活性进行鉴定。新品系的发现需要经过大规模的筛选，以找出毒力增高的分离株，或通过对新害虫进行筛选分离[29]。另外，借助于基因工程技术，改变晶体蛋白的组成，也可能提高毒效。一方面，晶体蛋白的组成改变后，有可能提高晶体在昆虫中肠的溶解性；另一方面，一些晶体蛋白混合后也可能发生协同作用而毒效增强[30]。再有，改变活体培养时的结晶条件，也可能改变晶体蛋白的溶解性而提高毒效[2]。

2.2 促进昆虫取食

δ-内毒素对许多昆虫都有拒食作用，这样昆虫对毒素的取食量不至过高，可减轻 δ-内毒素对昆虫的毒害作用。应用取食刺激剂能克服昆虫对 δ-内毒素的拒食作用，增大摄取量，从而提高 δ-内毒素的毒效。目前，取食刺激剂已有开发成功的商品出现，如 Coax、Entice。取食刺激剂的来源主要有以下两种：一是各种简单化合物及其组合，如糖类、脂类、氨基酸等[31,32]；二是寄主植物组织及其加工品，如玉米叶、棉花叶、棉籽油、棉籽的各种抽提物等[31~34]。取食刺激剂对 δ-内毒素的增效作用在许多实验室、温室及小规模田间试验中都得到了证实，大规模的田间试验还有待进一步完善、推广。

2.3 加强 δ-内毒素的溶解、活化及其与昆虫中肠的相互作用

2.3.1 物理方法：蛋白质分子的二硫键显著阻碍着晶体蛋白的溶解[35]。超声波振荡及动态磁场的磁化处理都可破坏 δ-内毒素的二硫键，改变分子构型，增加溶解度，提高毒效[36]。

2.3.2 化学添加剂：人们试图用一些简单的化学物质来提高 Bt 的毒效，这方面的研究取得了不少有益的结果。

蛋白质溶解剂，也可使二硫键的数量减少，增加 δ-内毒素在昆虫中肠的溶解性，而提高昆虫死亡率。据报道，磷酸甘油二钠盐、磷酸氢二钾、硫代乙醇钠、乙二胺四乙酸（EDTA）均有效地提高了 δ-内毒素的毒效[37,38]。Salama 等（1985）报道的 EDTA 与 Bt 产生了拮抗作用，可能是由于 EDTA 的浓度过高，影响了 δ-内毒素的酶解过程[37]。

一些碱性盐如氧化钙、碳酸钙、乙酸钙、硫酸钙、硫酸锌等与 δ-内毒素同时施用，一

方面导致肠道pH值升高,使δ-内毒素更易于溶解、活化;另一方面,改变了血淋巴的pH值和化学组成,影响昆虫的正常代谢,提高了昆虫对病原微生物的敏感性,从而大大提高了δ-内毒素的毒效[37~39]。

许多含氮化合物如丝氨酸、精氨酸、丙氨酸、色氨酸、乙酰胺、硝酸钠等对Bt都有很好的增效作用。不少氨基酸在低浓度时都有取食刺激剂的作用。另外,昆虫血淋巴中大部分氮是以氨基酸的形式存在的,改变血淋巴的组成,自然会影响正常的生理过程,使昆虫对毒素的敏感性提高[37,38]。

吐温系列是一类安全有效的增效剂,在田间已有施用。作为一种非离子表面活性剂的复合物,吐温在水和油中具双重溶解性,通过溶解中肠上皮细胞膜的脂类部分,有可能改变膜的渗透性[37];另外,作用于δ-内毒素,利于δ-内毒素与膜的结合及插入[2]。同样,一些脂肪酸盐对Bt也有显著的增效作用[40]。另据报道,一些有机酸如苹果酸、甲酸、硼酸等也可提高δ-内毒素的毒效[38,41]。在高浓度下有机酸对海灰翅夜蛾幼虫具有很高的毒性[37]。

2.3.3 植物它感素:植物在生长过程中产生多种它感素,用来防御昆虫的侵害。有些植物它感素会显著提高昆虫对病原微生物的敏感性[42],因而在杀虫微生物的增效研究上大有可为。

蕃茄中存在的抗性物质氯原酸和多酚氧化酶作用可形成邻苯醌,使蛋白质的—SH和—NH_2基团烷基化,影响蛋白质的溶解性和消化力,从而降低对昆虫的营养价值[43]。δ-内毒素中存在着不少可以烷基化的基团如半胱氨酸、赖氨酸和甲硫氨酸[44]。消化实验表明,烷基化加强了Bt晶体蛋白在活体条件下的溶解及活化。通过生物测定,氯原酸和多酚氧化酶与库斯塔克(*kurstaki*)亚种共育,提高了δ-内毒素对美洲棉铃虫*Heliothis zea*的毒力[45]。

蛋白酶抑制素是植物的一种有效的化学防御物质,能显著地抑制昆虫的生长发育。离体条件下,抑制昆虫肠道蛋白酶的活力;活体条件下,对蛋白酶活性的影响比较复杂,有的蛋白酶活力提高,有的下降,也有些影响不大[46,47]。MacIntosh(1990)报道,几种丝氨酸蛋白酶抑制素都不同程度地提高了Bt的毒效[48]。由于对δ-内毒素和蛋白酶抑制素的作用机制了解得还不很清楚,对二者增效作用的机理也只是推测。可能由于蛋白酶抑制素诱导了昆虫蛋白酶的超量产生[46],一方面加速了δ-内毒素酶解活化的过程,另一方面消耗了用于生长的氨基酸,提高了昆虫的易感性;也可能由于蛋白酶抑制素的抑制作用,抑制了δ-内毒素活力片段的进一步降解[2],或者抑制了刷状缘膜上受体蛋白的降解,延长了受体的半衰期,从而增强了δ-内毒素与受体结合的能力[48]。

丹宁是一种水溶性酚类化合物,广泛分布于维管植物中[49]。一直认为它作为一种蛋白质沉淀剂,通过与叶子的蛋白质形成不易消化的复合物或沉淀消化酶而降低植物组织的营养价值,影响昆虫正常的生长发育[50]。但后来的研究发现,丹宁可导致上皮破损、丧失再生能力、直至中肠坏死[51]。而且,植食性昆虫的中肠液不适于丹宁-蛋白质不溶性复合物的形成[49]。因此,丹宁可能是以毒素和拒食剂作用于昆虫的,尤其对那些在一般情况下不取食富含丹宁的植物的多食性昆虫。δ-内毒素与丹宁合用,可提高毒效[39,52,53]。没食子酸和间苯二酚能引起棉铃虫的畸形发育,如肠道破损、取食减少、生长缓慢、行动迟

缓[54]。它们与蜡螟变种的δ-内毒素合用，不仅降低了棉铃虫幼虫的取食量及体重增长，还提高了毒力[55]。苯丙烯酸和对羟基丙烯酸对δ-内毒素也有增效作用[56]。

酚糖酐是白杨的一种主要的它感素，可抑制舞毒蛾幼虫的生长。将舞毒蛾幼虫饲于不同的白杨树叶，Bt 的毒力产生了显著变异。对叶子的化学分析显示，酚糖酐与缩合单宁可能影响着 Bt 毒力。将酚糖酐和 Bt 一起加入人工饲料，大大提高了 Bt 的毒效[57]。酚糖酐可使中肠上皮破损[58]，加剧了δ-内毒素的作用，并使细菌更易于进入血腔，提高因败血症而引起的死亡率。另外，刀豆氨酸具有抗代谢活性，也可显著提高 Bt 的毒效。这种增效作用的产生可能是由于刀豆氨酸和δ-内毒素类似，也改变了中肠的渗透性，影响了活性物质的运输[59]。

2.3.4 几丁质酶：几丁质酶可以分解幼虫中肠的几丁质层，使细菌易于入侵。将几丁质酶加入 Bt，增强了对云杉卷蛾幼虫的毒效[60]。

2.4 昆虫病原微生物间的互作

不同的病原微生物混用，有可能提高致病力而增强毒效。Bt 松蠋 *entomocidus* 变种与柏氏 *berliner* 变种以及鲇泽变种与库斯塔克变种混用均可提高毒力[61]。核多角体病毒的作用方式与 Bt 类似，被幼虫食入并经消化液消化后，释放出有感染力的病毒粒子，病毒粒子在中肠细胞内复制增殖，而后进入血腔，随着血液循环到达各种靶标组织，进行第二次感染[62]。可见，核多角体病毒与 Bt 都是经口传染的病原微生物，中肠是二者作用的共同靶位。任何一方对中肠的破坏都可能加剧另一方的作用，因而产生增效作用。在亚致死浓度，Bt 与核多角体病毒混用有明显增效作用[63]。张循浩等（1996）利用 Bt 和棉铃虫核多角体病毒加适量助剂复配，制成生物杀虫剂——菌毒畏，提高了对害虫的击倒率和杀伤率，田间应用效果也高于同类生物药剂[64]。Bt 与病原真菌莱氏野村菌 *Nomuraea rileyi* 合用，毒力也有所提高[65]。

2.5 提高抗紫外线性能

提高δ-内毒素的抗紫外线性能，可增强δ-内毒素对环境的耐受性，从而延长毒效。为此，人们进行了种种尝试：筛选、培育抗紫外线的菌株[66,67]；使用紫外线屏蔽剂[68]；改变剂型如微型胶囊、淀粉颗粒剂[69,70]。上述方法均有效地提高了 Bt 的杀虫效果。

δ-内毒素的增效研究已取得不少很有应用价值的成果。不过，只有阐明了δ-内毒素在分子水平上的作用机制，才能从根本上更好地调控毒理过程、改造毒素化学组成，使之满足人们在杀虫范围、毒效、环境耐受性以至抗性等方面的需求。在许多问题上，我们的认识都很有限，有待于今后的研究工作去完善、澄清，如δ-内毒素本身的结构和功能；受体的性质及分布；δ-内毒素与受体相互作用的机制；孔洞或离子通道的生理结构及其在特定的传导状态或频率开合的动力学等等。相信随着这些问题的解决，会为δ-内毒素的增效研究提供更多更好的途径。

参 考 文 献

1 Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev., 1989, 53 (2): 242～255

2 Engligh L, Slatin S L. Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other

bacterial toxins. Insect Biochem. Molec. Biol., 1992, 22 (1): 1～7

3 Gill S S, Cowles E A, Pietrantonio P V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol., 1992, 37: 615～636

4 Tojo A, Aizawa K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. Appl. Environ. Microbiol., 1983, 45 (2): 576～580

5 Du Cheng, Martin P A W, Nickerson K W. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60 (1): 3 847～3 853

6 Aronson A I, Han Eun-soo, McGaughey W *et al*. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57 (4): 981～986

7 Haider M Z, Ellar D J. Functional mapping of an entomocidal δ-endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. J. Mol. Biol., 1989, 208: 183～194

8 Van Rie J, McGaugh W H, Johnson D E *et al*. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 1990, 247: 72～74

9 Wolfersberger M G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. Experientia, 1990, 46: 475～477

10 Escriche B, Martinez-Ramirez A C, Realk M D *et al*. Occurrence of three different binding sites for *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins in the midgut brush border membrane of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). Arch. Insect Biochem. Physiol., 1994, 26: 315～327

11 Oddou P, Hartmann H, Radecke F *et al*. Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA (b) δ-endotoxin. Eur. J. Biochem., 1993, 212: 145～150

12 Estada U, Ferre J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60 (10): 3 840～3 846

13 English L H, Readdy T L. Delta-endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*. Insect Biochem., 1989, 19: 145～152

14 Readdy T L, English L. Brush border proteins isolated from a delta-endotoxin affinity matrix catalyze toxin reception. Meeting of the Entomological Society of America. 1989

15 Sangadala S, Walters F S, Engish L H *et al*. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA (c) toxin binding and $^{86}Rb^{+}$-K^{+} efflux in vitro. J. Biol. Chem., 1994, 269 (13): 10 088～10 092

16 Valatis A P, Lee M K, Rajamohan F *et al*. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serve as the receptor for the CryIA (c) δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Molec. Biol., 1995, 25 (10): 1 143～1 151

17 Wolfersberger M G. Inhibition of potassium-gradient-driven phenylalanine uptake in larval *Lymantria dispar* midgut by two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins correlates with the activity of the toxins as gypsy moth larvicides. J. Exp. Biol., 1991, 161: 519～525

18 Hideshi I, Kuroda E, Wadano A *et al*. Specific toxicity of δ-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. Biosci. Biotech. Biochem., 1993, 57 (2): 200～204

19 Harvey W R, Crawford D N, Eisen N S *et al*. The potassium impermeable apical membrane of insect epithelia: a target for the development of safe pesticides. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 1987, 82 (Suppl. Ⅱ): 29～34

20 Sacchi F V, Parenti P, Hanozet G M *et al*. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K^{+}-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brasicae* midgut cells. FEBS Lett., 1986, 204: 213～218

21 Hendrickx K, De Loof A, van Mellaert H. Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of

brush border membrane vesicles from tobacco hawk worm (*Manduca sexta*) midgut. Comp. Biochem. Physiol., 1989, 95C: 214～245

22 Slatin S L, Abrams C K, English L. Delta-endotoxin in planar lipid bilayers. Biochem. Biophys. Res. Com., 1990, 169: 765～772

23 Knowles B H, Ellar D J. Colloid-osmatic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 924: 509～518

24 Carrol J, Ellar D J. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. Eur. J. Biochem., 1993, 214: 771～778

25 Schwartz Jean-Louis, Garneau L, Masson L *et al.* Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1065: 250～260

26 Martin F G, Wolfersberge M G. *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles act synergistically to cause very large increase in the conductance of planar lipid bilayers. J. *Experi.* Biol., 1995, 198: 91～96

27 Parenti P, Villa M, Hanozet G M *et al.* Interaction of the insecticidal crystal protein CryIA from *Bacillus thuringiensis* with amino acid transportor into brush border membrane from *Bombyx mori* larval midgut. J. Invertebr. Pathol., 1995, 65: 35～42

28 Reuveni M, Dunn P E. Differential inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin of leucine and aspartic acid uptake into BBMV from midgut of *Manduca sexta*. Biochem. Biophys. Res. Com., 1991, 181 (3): 1 089～1 093

29 Chilcott C N, Wigley P J. Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strains. Agric. Ecosyst. Environ., 1994, 49 (1): 51～57

30 Wu D, Chang F N. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelesis* crystal. FEBS Lett., 1989, 190: 232～236

31 Salama H S, Foda S, Sharaby A. Role of feeding stimulants in increasing the efficacy of *Bacillus thuringiensis* versus *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Entomol. Gen., 1985, 10 (2): 111～119

32 Bartelt R J, McGuire M R, black D A. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol., 1990, 19 (1): 182～189

33 El-Nockrashy A S, Salama H S, Taha F. Influence of bait formulations on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lep., Noctuidae). J. Appl. Entomol., 1986, 101: 381～389

34 Gillespie R L, McGuire M R, Shasha B S. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol., 1994, 87 (2): 452～457

35 Nickerson K W. Structure and function of *Bacillus thuringiensis* protein crystal. Biotechnol. and Bioengin., 1980, 22: 1 305～1 333

36 Salama H S, El-Baset M S A, Ragaei M. Mode of action of chemical additives in enhancing the potency of *Bacillus thuringiensis* against lepidopterous insects. J. Appl. Entomol., 1992, 114: 167～173

37 Salama H S, Foda M S, Sharaby A. Potential of some chemicals to increase the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* Berl. against *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Z. Ang. Entomol., 1985, 100: 425～433

38 El-Moursy A, Aboul-Ela R, Salama H S *et al.* Chemical additives that affect the potency of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Plodia interpunctella*. Insect Sci. Appl., 1992, 15 (6): 775～779

39 Salama H S, Foda M S, Sharaby A. Novel biochemical avenues for enhancing *Bacillus thuringiensis* endotoxin potency against *Spodoptera littoralis* (Lep.: Noctuidae). Entomophaga, 1984, 29 (2): 171～178

40 Gaudet M D, Puritch G S. Fatty acid salt enhancement of bacterial insecticide. U. S. Patent 4826678

41 Charless C D, Wallis R. Enhancement of the action of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on *Porthetria dispar* (Linn.) in laboratory tests. J. Insect Pathol., 1964, 6: 423～429

42 Berenbaum M R. Allelochemicals in insect-microbe-plant interactions: Agents provocateurs in the coevolutionary arms race. In: Barabosa P, Letourneau K ed. Novel aspects of insect-plant interactions. New York: Wiley, 1988, 97～123

43 Felton G W, Donato K, Del Vecchio R J *et al*. Activation of plant polyphenol oxidases by insect feeding reduces the nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. J. Chem. Ecol., 1989, 15: 2 667～2 694

44 Schnepf H E, Wong H C, Whiteley H R. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem., 1985, 260: 6 264～6 272

45 Ludlum C T, Felton G W, Duffey S S. Plant defenses: chlorogenic acid and polyphenol oxidase enhance toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to *Heliothis zea*. J. Chem. Ecol., 1991, 17 (1): 217～237

46 Broadway R M, Duffey S S. Plant protease inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*. J. Insect Physiol., 1986, 32 (10): 827～833

47 王琛柱，项秀芬，张书芳等. 大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响. 昆虫学报，1995, 38 (3): 272～273

48 MacIntosh S C, Kishore G M, Perlak F J *et al*. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. J. Agric. Food Chem., 1990, 38 (4): 1 145～1 152

49 Martin M M, Rockholm D C, Martin J S. Effects of surfactants, pH, and certain cations on precipitation of proteins by tannins. J. Chem. Ecol., 1985, 11 (4): 485～494

50 Rhoades D F, Cates R G. A general theory of plant antiherbivore chemistry. Recent Adv. Phytochem. 1976, 10: 168～213

51 Steinly B A, Berenbaum M. Histopathological effects of tannins on the midgut epithelium of *Papilio polyxenes* and *Papilio glaucus*. Entomol. Exp. Appl., 1985, 39: 3～9

52 Gibson D M, Gallo L G, Krasnoff S T *et al*. Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. J. Econ. Entomol., 1995, 88 (2): 270～277

53 Wang C Z, Zhang S F, Zhang J H *et al*. Influence of tannic acid on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Helicoverpa armigera* (Hübner). Entomologia Sinica, 1997, 4 (1): 74～81

54 Ananthakrishnan T N, Senrayan R, Annaclurai R S *et al*. Antibiotic effects of resorcinol, gallic acid and phloroglucinol on *Heliothis armigera* Hübner (Insecta: Noctuidae). Proc. Indian Acad. Sci., (Anim. Sci.) 1990, 99: 39～52

55 Sivamani E, Rajendran N, Senrayan R *et al*. Influence of some plant phenolics on the activity of δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galleiae* on *Heliothis armigera*. Entomol. Exp. Appl., 1992, 63: 243～248

56 Brewer G J, Anderson M D. Modification of the effect of *Bacillus thuringiensis* on sunflower moth (Lepidoptera: Pyralidae) by dietary phenols. J. Econ. Entomol., 1990, 83 (6): 2 219～2 224

57 Hwang S Y, Lindroth R L, Montgomery M E *et al*. Aspen leaf quality affects gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol., 1995, 88 (2): 278～282

58 Lindroth R L, Scriber J M, Hsia M T S. Chemical ecology of the tiger swallowtail: mediation of host use by phenolic glycosides. Ecology, 1988, 69: 814～822

59 Felton G W, Dahlman D L. Allelochemical induced stress: Effects of L-canavanine on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* in *Manduca sexta*. J. Invertbr. Pathol., 1984, 44: 187～191

60 Smirnoff W A. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. Can. Entomologist, 1971, 103: 1 829～1 831

61 Nadarajan L, Martouret D. Synergistic action of different strains of *Bacillus thuringiensis* against cotton leaf worm *Spodoptera littoialis* (Boisduval). Curr. Sci., 1994, 67 (8): 610～612

62 庞 义. 昆虫病毒病. 见：蒲蛰龙主编. 昆虫病理学. 广州：广东科技出版社，1994, 92～117

63 Bell M R, Romine C L. *Heliothis virescens* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Dosage effects of feeding mixtures of *Bacillus thuringiensis* and a nuclear polyhedrosis virus on mortality and growth. Environ. Entomol.,

1986, 15 (6): 1 161～1 165

64 张循浩,张翠珍,马振泉等. 菌毒畏防治抗性棉铃虫的效果及对天敌的影响. 中国生物防治, 1996, 12 (1): 1～4

65 Ignoffo C M, Garcia C, Kroha M J *et al.* Effects of bacteria and a fungus fed singly or in combination on mortality of larvae of the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). J. Kans. Entomol. Soc., 1980, 53 (4): 797～800

66 Salama S S, Ali A M M, Sharaby A. *Bacillus thuringiensis* Berliner resistant to high temperature and ultraviolet radiation. J. Appl. Ent., 1991, 112: 520～524

67 Patel K R, Wyman J A, Patel K A *et al.* A mutant of *Bacillus thuingiensis* producing a dark brown pigment with increased UV resistance and insecticidal activity. J. Invertebr. Pathol., 1996, 67: 120～124

68 Liu Y-T, Sui M-J, Ji D-D *et al.* Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Invertebr. Pathol., 1993, 62: 131～136

69 Dunkle R L, Shasha B S. Starch encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol., 1988, 17: 120～126

70 Ahmed S M, Nagamma M V, Majumder S K. Studies on granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. Berliner. Pestic. Sci., 1973, 4: 19～23

MECHANISM AND POTENTIATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* δ-ENDOTOXIN INSECTICIDAL ACTIVITY

Zhang Jihong　　Wang Chenzhu　　Qin Junde

(Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract *Bacillus thuringiensis* (Bt) has been widely used because of its specificity for target insects, its low development cost and its environmental compatibility. Much efforts are devoted to the mechanism of its action and the enhancement of its toxicity. This paper is confined to Cry I δ-endotoxin to present the progress of studies on these points. The mode of action of δ-endotoxin includes 5 steps: solubilization, degradation, binding with receptors, intercalation and formation of pore or channel. In order to improve the toxicity of δ-endotoxin, various physical and chemical factors including plant allelochemicals are used for strengthening the solubilization, degradation of δ-endotoxin, or the interaction between δ-endotoxin and insect midgut. Other means such as screening higher toxicity strains of Bt, using the feeding stimulants to increase larval ingestion, protecting δ-endotoxin from ultraviolet irradiation and coöperatinig with other microbes, are also proved to be effective in the potentiation of δ-endotoxin.

Key words *Bacillus thuringiensis*, mode of action, potentiation